

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-116385

(43)Date of publication of application : 22.04.2003

(51)Int.Cl.

A01H 5/00  
C12N 15/09

(21)Application number : 2001-316859

(71)Applicant : UNIV OF THE RYUKYUS

(22)Date of filing : 15.10.2001

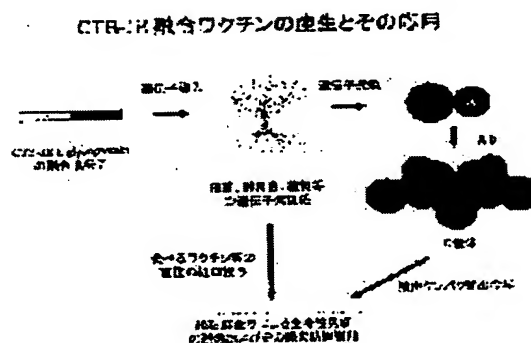
(72)Inventor : SHINKAWA TAKESHI  
TADANO MASAYUKI  
MATSUMOTO YASUKI  
TSUJI NAOTOSHI  
SATO YOSHINARI  
FUKUNAGA TOSHIHIKO  
SATO SHIGETOSHI  
NAGAMINE MASARU  
KURANE ICHIRO

## (54) TRANSGENIC PLANT CONTAINING GENE ENCODING JAPANESE B ENCEPHALITIS VACCINE

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide both a transgenic plant containing a gene encoding a Japanese B encephalitis vaccine and the Japanese B encephalitis vaccine expressed by the plant.

SOLUTION: This transgenic plant contains the gene encoding a fusion protein of a mucosal immunological carrier and a Japanese B encephalitis virus E glycoprotein and transduced therinto. In particular, the transgenic plant contains the mucosal immunological carrier which is a chorela toxin B subunit protein (CTB). In the transgenic plant, the plant is tobacco.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

15.10.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision  
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-116385

(P2003-116385A)

(43) 公開日 平成15年4月22日 (2003. 4. 22)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
A 0 1 H 5/00	Z N A	A 0 1 H 5/00	Z N A A 2 B 0 3 0
C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4

審査請求 有 請求項の数 6 O L (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2001-316859 (P2001-316859)

(22) 出願日 平成13年10月15日 (2001. 10. 15)

(71) 出願人 397076659

琉球大学長

沖縄県中頭郡西原町字千原1番地

(72) 発明者 新川 武

沖縄県那覇市首里石嶺町2-96-1 琉球

大学医学部職員宿舎4号棟301号室

(72) 発明者 只野 昌之

沖縄県沖縄市高原4-16-30

(72) 発明者 松本 安喜

東京都北区王子6-2-7-304

(74) 代理人 100058479

弁理士 鈴江 武彦 (外5名)

最終頁に続く

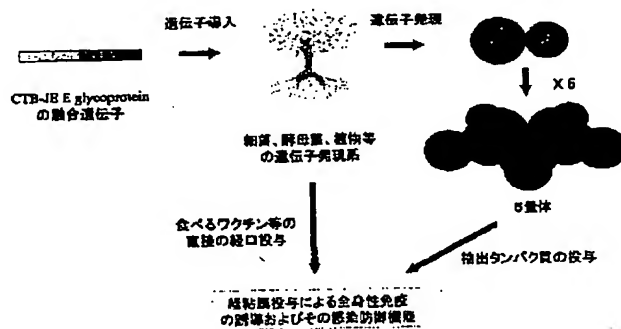
(54) 【発明の名称】 日本脳炎ワクチンをコードする遺伝子を含むトランスジェニック植物

(57) 【要約】

【課題】 日本脳炎ワクチンをコードする遺伝子を含むトランスジェニック植物を提供することを目的とする。さらに、本発明は、前記植物によって発現された日本脳炎ワクチンを提供することを目的とする。

【解決手段】 本発明は、粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外殻タンパク質 (E glycoprotein) の融合タンパク質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック植物を提供する。特に、前記粘膜免疫運搬体がコレラトキシンB鎖タンパク質 (CTB) であるトランスジェニック植物、および前記植物がタバコであるトランスジェニック植物を提供する。

CTB-JE 融合ワクチンの産生とその応用



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質の融合タンパク質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック植物。

【請求項2】 前記粘膜免疫運搬体がコレラトキシンB鎖タンパク質（CTB）である、請求項1に記載のトランスジェニック植物。

【請求項3】 前記日本脳炎ウイルス外郭タンパク質が、Eglycoproteinである、請求項1または2に記載のトランスジェニック植物。

【請求項4】 pBI121-CTB-JEが導入されたトランスジェニック植物。

【請求項5】 前記植物がタバコである、請求項1～4の何れか一項に記載のトランスジェニック植物。

【請求項6】 日本脳炎ウイルスワクチンとしての使用するための、請求項1～5のいずれか一項に記載のトランスジェニック植物。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質（Eglycoprotein）の融合タンパク質をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック植物に関する。

**【0002】****【従来の技術】 発明の背景**

日本脳炎ワクチンを含む従来のワクチンは、不活化ワクチンが主流であり、その接種法に関しては注射器を用いた接種が最も広く用いられている。現行の日本脳炎ワクチンは、マウスの脳内にウイルスを接種し、ウイルスが増殖した頃に脳を取り出してウイルスを分離、精製、不活化の処理を行う。このようなワクチンは、多くの動物を犠牲にするという倫理的問題もあるが、コスト的な問題がさらに深刻である。従来型のワクチンの普及は、先進諸国においては何ら問題がないが、マラリア、デング熱、日本脳炎など、多くの感染症の蔓延に悩まされているのは、アジア、アフリカ、中南米諸国の経済途上国がほとんどである。

【0003】 その普及に費用がかかりすぎるという理由から、経済途上国での集団接種に関して、東南アジアやアフリカ地域で従来型ワクチンの接種を普及させることはきわめて困難であり、世界規模での感染症対策が円滑に行えないというのが現状である。

【0004】 遺伝子組換え技術によって作り出された組換えタンパク質ワクチンの経口および経鼻などの経粘膜免疫法は、注射器を必要としない易接種型ワクチンであり、コスト的にも従来型ワクチンより優れている。また免疫学的にも同等な効果を得ることが可能である。その中でも特に、組換え植物を使用した「食べるワクチン」は、経粘膜ワクチンの究極的な接種法であり、コスト面できわめて優れている。経済的な問題からワクチンの普

及がきわめて困難であるという世界的な状況を考慮すると、これからのワクチン開発は、食べるワクチンなどの植物由来組換えワクチンを含む、様々な経粘膜ワクチンを重点的に行う必要がある。また、先進諸国には新規産業としても、国際貢献的立場からも魅力ある分野である。

**【0005】 従来技術**

日本脳炎ウイルスワクチンとして機能する物質はタンパク質である。日本脳炎ワクチンは感染マウス脳乳剤から精製された不活化ワクチンであり、皮下注射によって接種される。感染経路がポリオやインフルエンザのように腸管や呼吸器の粘膜ではなく、媒介蚊の吸血によって伝播する日本脳炎では、ワクチンを粘膜から接種するという発想はなかった。しかし鼻腔等から粘膜免疫が可能であれば、注射器が不溶となり接種経費を大幅に下げることが期待される。そこで、日本脳炎ワクチンを鼻腔粘膜から接種することが試みられた。その結果、鼻腔内接種法は、従来の接種法と同様のウイルス感染防御効果を誘導することが可能であった。粘膜投与による日本脳炎ウイルス粒子に対して特異的に抗体を誘導するために、経粘膜免疫組織に特異的親和性を持つコレラトキシンB鎖（CTB）と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質（Eglycoprotein）（JE）との融合遺伝子を作製し、その遺伝子を各生物種（細菌、酵母）に導入することにより、融合タンパク質（CTB-JE Eglycoprotein）の産生を可能とした。上記日本脳炎ウイルスワクチンとして利用可能な、CTB-JE Eglycoproteinの融合タンパク質は、細菌や酵母、昆虫細胞、等の各種遺伝子発現系において産生される。それらの発現系から融合タンパク質を抽出し、経口、経鼻粘膜から投与することによって全身系の感染防御的免疫を誘導することが可能であった。

【0006】 また、従来、皮下注射によって接種される場合、夾雑物が含まれているとその夾雑物に対する免疫応答が誘導される可能性があったが、経口投与によって経粘膜投与される場合、夾雑物による免疫応答は誘導されずに、粘膜を介して吸収結合されるタンパク質のみに免疫応答が誘導可能であった。

【0007】 特に、植物ワクチンの場合、食用の植物に遺伝子発現させることにより、直接腸管粘膜を介して免疫することが可能である。上記の構成およびその粘膜免疫投与法は、ヒト、家畜動物を含む脊椎動物全般に応用できるものであり、「食べるワクチン」としての利用が期待されている。そこで、経粘膜日本脳炎ワクチンとして、上記遺伝子の導入されたトランスジェニック植物の作製が望まれていた。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】 このような問題を解決するために、本発明は、日本脳炎ワクチン（粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質（Eglic

oprotein) の融合タンパク質) をコードする遺伝子が導入されたトランスジェニック植物を提供することを目的とする。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、粘膜免疫運搬体(コレラトキシンB鎖タンパク質(CTB))と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質(Eglycoprotein)との融合タンパク質が、日本脳炎ワクチンとして機能することを見出し、かつ前記タンパク質を発現するトランスジェニック植物を作製することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】すなわち、本発明は、粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質(Eglycoprotein)の融合タンパク質をコードする遺伝子を含むトランスジェニック植物を提供する。

【0011】本発明は、さらに前記粘膜免疫運搬体がコレラトキシンB鎖タンパク質(CTB)である、前記トランスジェニック植物、および前記日本脳炎ウイルス外郭タンパク質が、Eglycoproteinである、請求項1または2に記載のトランスジェニック植物を提供する。

【0012】より好ましくは、本発明は、pBI121-CTB-JEが導入されたトランスジェニック植物を提供する。

【0013】また、本発明は前記植物がタバコである、前記トランスジェニック植物を提供する。

【0014】さらに、本発明は、日本脳炎ワクチンとして使用するための、前記トランスジェニック植物を提供する。以下本発明を詳細に説明する。

#### 【0015】

【発明の実施の形態】本発明のトランスジェニック植物には、粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質(JEV)との融合タンパク質をコードする遺伝子が導入される。前記融合タンパク質は、粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス外郭タンパク質が、インフレームとなるように連結されたタンパク質である。

【0016】ここで、「粘膜免疫運搬体」とは、粘膜組織に特異的親和性を有するタンパク質をいう。前記粘膜免疫運搬体は、たとえばコレラトキシンB鎖タンパク質、毒素原性大腸菌(LTB)、サルモネラ菌もしくは乳酸菌等の細菌、ウイルス、病原体、またはその他に由来する、粘膜細胞表面に親和性を有するタンパク質を使用することができる。本発明の一つの態様において、前記粘膜免疫運搬体は、好ましくはコレラトキシンB鎖タンパク質(CTB)である。

【0017】本発明の一つの態様において、前記日本脳炎ウイルス外郭タンパク質は、日本脳炎ウイルスのタンパク質であって、好ましくは、外郭に含まれるEglycoproteinである。

【0018】前記融合タンパク質をコードする遺伝子の取得方法は特に限定されないが、前記DNAは、たとえば以下のように作製することができる。

【0019】CTB、および日本脳炎ウイルス外郭タンパク質JEV(Eglycoprotein)をコードするcDNA配列は既知であるので、その配列を基にしてプライマーを設計し、通常のPCR法を使用して、又は化学合成によって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることにより、本発明の遺伝子を得ることができる。

【0020】前記プライマーは、C'末端側にEタンパク遺伝子を融合可能な配列を含んでいてもよい。また、N'端側には真核生物での発現効率を高めるためのKozac配列、C'端側のBamHIまたはSpeIサイトにインフレームで外来遺伝子を融合可能にする配列を含むプライマーを設計してもよい。

【0021】具体的には、前記融合タンパク質のうち、コレラトキシンB鎖由来タンパク質をコードするDNAの取得法としては、たとえば、以下の反応条件、テンプレート、およびプライマーを使用してPCRを行うことによって増幅できる；

テンプレート：プラスミドpM2、

N-terminal primer：

5'-GCGCCATGGTTAAATTAAAATT  
TGGTGTT-3' (配列番号1)

C-terminal primer：

5'-CGCGAGCTCTTAAAGTTTCATCC  
TTTTTCGGATCCTGGACTAGTAGGGG  
TACCGGGCCCGGGTCCATTGTCCAT  
ACTAATTGCGGCAATCGC-3' (配列番号2)

PCR条件：94℃において3分の後、94℃において45秒、55℃において1分、72℃において1分を30サイクル、次に72℃において10分。

【0022】また、日本脳炎ウイルスのRNAゲノムをテンプレートとしたRT-PCR法によって、日本脳炎ウイルス外郭タンパク質(Eglycoprotein)を増幅すればよい。設計したプライマーは、その塩基配列に従って化学合成することができる。PCRは常法に従って行うことができる。たとえば、以下の反応条件、テンプレート、およびプライマーを使用してPCRを行うことによって増幅できる；

N-terminal primer：

5'-GCGGGATCCACCTATGGCATGT  
GCACA-3' (配列番号3)

C-terminal primer：

(C1)

5'-GCGACTAGTTCCGAAGGGGGGT  
TCCAT-3' (配列番号4)

(C2)

5' -GCGACTAGTAGCTTTATGCCAA  
TGGTG-3' (配列番号5)

(C3) 5' -GCGACTAGTCCCTTGTGT  
GATCCAAGA-3' (配列番号6)

94℃において3分の後、94℃において1分、55℃  
において1分、72℃において1分を30サイクル、次  
に72℃において10分。

【0023】増幅された配列は、たとえば制限酵素で切  
断した後に、市販のプラスミドにクローニングすること  
ができる。このプラスミドを公知の方法(例えば、J.  
sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2nd Ed., Cold  
Spring Harbour Laboratory  
Press, pp. 1. 21-1. 52)に従って  
単離精製する。そして、サンガー法やマクサム・ギルバ  
ート法等の公知の方法、および自動塩基配列決定装置  
(ABI DNA sequencer 310)を用い  
て塩基配列を決定できる。

【0024】前記融合タンパク質は、免疫誘導活性を有  
する限り、当該アミノ酸配列において少なくとも1個の  
アミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてよい。  
上記のような変異は、例えば、融合タンパク質のアミノ  
酸配列の少なくとも1個、好ましくは1~50個程度、  
さらに好ましくは1~20個のアミノ酸が欠失してもよ  
く、又は、融合タンパク質のアミノ酸配列に少なくとも  
1個、好ましくは1~50個程度、さらに好ましくは1  
~20個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、融合  
タンパク質のアミノ酸配列の少なくとも1個、好ましく  
は1~50個程度、さらに好ましくは1~20個のアミ  
ノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。免疫誘導活性を  
有している限り、より短い、またはより長いペプチド配  
列をコードしてもよい。遺伝子に変異を導入するには、  
Kunkel法や Gapped duplex法等の公  
知の手法又はこれに準ずる方法により、例えば部位特異  
的突然変異誘発法を利用した変異導入用キットなどを用  
いて行うことができる。

【0025】なお、免疫誘導活性とは、前記融合タンパク  
質を投与された動物が、前記融合タンパク質を異物とし  
て認識し、前記融合タンパク質に対する抗体を体内に生  
産し、かつ該抗体が前記融合タンパク質の活性部分に作  
用して日本脳炎ウイルスの活性を阻害する活性である。

【0026】次に、粘膜免疫運搬体と日本脳炎ウイルス  
外殻タンパク質(E glycoprotein)との  
融合タンパク質をコードする遺伝子を含むベクターを作  
製する方法について説明する。

【0027】植物導入用組換えベクターの作製及びアグ  
ロバクテリウムの形質転換植物導入用組換えベクター  
は、上述のように得られたDNAを、そのまま、または  
所望により適当な制限酵素で消化し、あるいは、適切な  
リンカーを連結して構築することができる。DNAを挿

入するためのベクターとして、pBI101、pBI1  
21、pGA482等のバイナリーベクターやpLGV  
23Neo、pNCAT、pMON200などの中間ベ  
クターが挙げられるが、これらのベクターに限定されな  
い。

【0028】前記融合タンパク質をコードする遺伝子  
は、その遺伝子の機能が発揮されるようにベクターに組  
み込まれることが必要である特に植物体内で、外来遺伝  
子などを発現させるためには、構造遺伝子の前後に、そ  
れぞれ植物用のプロモーターとターミネーターを配置さ  
せる必要がある。本発明で利用可能なプロモーターとし  
ては、例えばカリフラワーモザイクウイルス(CaM  
V)由来の35S転写物[Jefferson, R.  
A. et al.: *The EMBO J* 6:3  
901-3907 (1987)]、トウモロコシのユビ  
キチン[Christensen, A. H. et  
al.: *Plant Mol. Biol.* 18:67  
5-689 (1992)]、ノパリン合成酵素(NO  
S)遺伝子、オクトピン(OCT)合成酵素遺伝子、イ  
ネのアクチン(Act1)遺伝子等のプロモーターが挙  
げられ、ターミネーター配列としては、例えばカリフラ  
ワーモザイクウイルス由来やノパリン合成酵素遺伝子由  
来のターミネーター等が挙げられる。但し、植物体内で  
機能することが知られているプロモーターやターミネ  
ーターであれば、これらのものに限定されない。

【0029】また、必要に応じてプロモーター配列と前  
記DNAとの間に、遺伝子の発現を増強させる機能を持  
つイントロン配列、例えばトウモロコシのアルコールデ  
ヒドロゲナーゼ(Adh1)のイントロン[*Genes  
& Development* 1:1183-1200  
(1987)]を導入することができる。さらに、効率  
的に目的の形質転換細胞を選択するために、有効な選択  
マーカー遺伝子を併用してもよい。その際に使用する選  
択マーカーとしては、抗生物質ハイグロマイシンに対す  
る抵抗性を植物に付与するハイグロマイシンホスホトラ  
ンスフェラーゼ(htp)遺伝子、ピアラホス(bia  
laphos)に対する抵抗性を付与するホスフィノス  
リシンアセチルトランスフェラーゼ(bar)遺伝子、  
ブラストサイジンSに対する抵抗性を付与するブラスト  
サイジンSデアミナーゼ(BSD)遺伝子などが挙げら  
れる。

【0030】また、CTBと融合遺伝子の分子間摩擦を  
最小限にとどめるため、CTBと融合遺伝子の間にはヒ  
ンジ領域を挿入してもよい。ヒンジ領域は、たとえば、  
GPGPを1単位としてシングル、ダブル、トリプルと  
タンデムに3種構築することができる。その際、ヒンジ  
領域のコドンは植物種では比較的使用頻度の低いもの  
を使用し、タンパク翻訳の際リボソームが一時停止ある  
いは減速するようにすればよい。

【0031】さらに、植物細胞の小胞体内で組換えタン

パク質が効率よく蓄積し、融合タンパク質が5量体を形成しやすくするために、小胞体残留シグナル (SEKDEL) を融合タンパク質のC' 端側に挿入してもよい。その際、SEKDELはコドン頻度の最も高いものを使用し、その後ろにストップコドンTGAを挿入すればよい。

【0032】 所望により、さらにエンハンサーなどのシスエレメント、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、リボソーム結合配列 (SD配列) などを含有するものを連結することができる。

【0033】 融合タンパク質をコードする遺伝子をバイナリーベクターに挿入するには、まず、精製されたDNAを適当な制限酵素で切断し、適当なベクター DNAの制限酵素部位又はマルチクローニングサイトに挿入してベクターにライゲーションする方法などが採用される。

【0034】 前記組換えベクターの例として、たとえば、前記融合タンパク質をコードする遺伝子をpBI121ベクターに挿入すればよい。

【0035】 まず、pBI系植物発現ベクターの下流に、CTB領域をコードする遺伝子を含む発現ベクターを構築する (図3、4)。このようなベクターに、JEV cDNAのEタンパク質領域を挿入し、JEV/CTB融合タンパク質を発現可能なベクターを構築する (図5)。

【0036】 たとえば、前記のように構築されたCTB遺伝子を含む融合遺伝子をCTBh<sub>1-3</sub>SEKDELとして、プラスミドベクターpIBT210、1内のカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に挿入して、pIBT210、1-CTBh<sub>1-3</sub>SEKDELを作製する (図3)。

【0037】 次にこのプラスミドベクターからCTBh<sub>1-3</sub>SEKDEL発現カセットを持つT-DNA領域全体をHindIII-EcoRIで切り出し、植物発現ベクターpBI121のHindIII-EcoRIフラグメントと入れ換えてpBI121-CTBh<sub>1-3</sub>SEKDELを作製する (図4)。この植物発現ベクターは、CTBの下流にBamHIおよびSpeIサイトを有し、これらの制限酵素サイトに外来遺伝子を挿入するとCTBとインフレームになり、CTB融合タンパク質を産生できる。

【0038】 上記pBI121-CTBh<sub>1-3</sub>SEKDELのBamHI-SpeIサイトにJEVEglycoproteinの全長を挿入して、CTB-JEVE融合遺伝子を構築する (pBI121-CTB-JEVE) (図5)。上記のようにDNA sequence rを使用して、融合遺伝子の前塩基配列を確認し、CTBとJEVE遺伝子がインフレームであることを確認する。

【0039】 次に、前記融合タンパク質をコードする遺

伝子を導入したトランスジェニック植物を作製する方法について説明する。

【0040】 本発明において、植物とは、植物培養細胞、栽培植物の植物体、植物の器官 (例えば葉、花弁、茎、根、根茎、種子等)、または組織 (例えば表皮、師部、柔組織、木部、維管束等) のいずれをも意味するものである。ここで使用する植物種としては、特に制限はないが、イネ、ムギ、タバコ、トマト、シロイヌナズナなど様々な植物が挙げられる。好ましくは、トマト、ナス、ピーマン、タバコ等のナス科植物である。さらに好ましくはタバコがあげられる。

【0041】 本発明において遺伝子が導入される植物の形態としては、植物体に再生可能なあらゆる種類の形態の植物細胞が含まれる。例えば、培養細胞、プロトプラスト、苗条原基、多芽体、毛状根、カルスが挙げられるが、これらに制限されない。本発明における植物細胞には、植物体中の細胞も含まれる。

【0042】 前記融合タンパク質をコードする遺伝子による植物の形質転換は、当技術分野における技術者に公知の種々の方法を用いて導入することが可能である。前記遺伝子を含むベクターをアグロバクテリウムのバイナリーベクター法、パーティクルガン法、またはポリエチレングリコール法などで植物宿主に導入することにより行うことができる。あるいはプロトプラストにエレクトロポレーション法で導入して形質転換することもできる。

【0043】 パーティクルガン法による直接遺伝子導入は、選択マーカー遺伝子を含むベクターと前記遺伝子を含むベクターとを混合して、同時に植物の細胞に撃ち込むコトランスフォーメーション (co-transformation) 法により行うことができる。形質転換の結果得られるシュート、毛状根などは、細胞培養、組織培養または器官培養に用いることが可能であり、また従来知られている植物組織培養法を用い、適当な濃度の植物ホルモンの投与などにより植物体に再生させることができる。

【0044】 アグロバクテリウムのバイナリーベクター法を用いる場合、上記のバイナリーベクターの境界配列 (LB, RB) 間に、目的遺伝子を挿入し、この組換えベクターを大腸菌中で増幅する。次いで、増幅した組換えベクターをアグロバクテリウム・チューメファシエンス LBA4404、EHA101、C58C1Rif<sup>r</sup>等に導入し、これを植物への形質導入用に用いる。

【0045】 たとえば、タバコに導入する場合、以下のようにして形質導入を行えばよい。無菌培養した非組換えたばこ (N. tabacum) の葉を切り出し、1.5-2cm四方の大きさに切る。切り取った葉は感染が起りやすいように、ナイフで所々に傷を付け、上記のように組換えたアグロバクテリウムの培養液 (O. D<sub>600</sub> = 1 × 10) に3分間浸す。その後、葉についた

アグロバクテリウム液をできるだけ取り除きMS寒天培地の上に必ず裏返して（気孔側を上にして）隙間なく敷き詰める。

【0046】シャーレをパラフィルムで閉じて、2カ所ほど空気孔をあけ、暗室で3日間室温においてインキュベートして感染を促す。

【0047】3日後、暗室に入れておいた葉を抗生物質（カナマイシン）（50 $\mu$ g/ml）と植物ホルモン（オーキシンおよびサイトキニン）を含むMS shoot growth mediumに移し替え、カルスの誘導を行う。2～3週間でカルスから芽が出始めるので、出てきた芽をカルスから切り取り抗生物質（カナマイシン）（50 $\mu$ g/ml）のみを含むMS root growth medium入りのMagna Boxに移し替え、植物の無菌培養を作製し、組換えタバコを得ることができる。

【0048】本発明の遺伝子が導入された植物は、選択マーカーによるスクリーニング、または遺伝子もしくはその発現産物の解析により、遺伝子を保持する形質転換細胞を選択することが可能である。たとえば、得られたトランスジェニック植物及びその次世代に目的とする遺伝子が組み込まれていることの確認は、これらの細胞及び組織から常法に従ってDNAを抽出し、公知のPCR法またはサザンブロット法などを用いて、導入した遺伝子を検出することにより行うことができる。得られたトランスジェニック植物は、土壌またはバーミキュライトを詰めたポットで栽培し、株分けする。このようにして得られた遺伝子導入植物も、本発明の範囲に含まれる。また、本発明の遺伝子の植物組織内での発現部位は、例えば各組織におけるmRNAの発現またはタンパク質の発現を解析することにより確認することができる。具体的には、本発明トランスジェニック植物による発現の確認方法として、RT-PCR法、ノーザンブロット法等が挙げられ、抗体を用いたウエスタン解析法等が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0049】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例にその技術的範囲が限定されるものではない。

【0050】1. アグロバクテリウムによるCTB-JEの発現。

#### 【0051】方法

CTB-JEV Eタンパク質融合遺伝子の構築  
以下のようにしてコレラトキシンB鎖タンパク質と日本脳炎ウイルス外殻タンパク質（Eglycoprotein）との融合タンパク質を含む発現ベクターを作製した（図3）。

【0052】粘膜免疫アジュバントとしてコレラトキシンB鎖遺伝子をプラスミドpM2からPCR増幅し、そのC'末端側にEタンパク遺伝子を融合可能なようにし

た。CTB遺伝子を増幅する際、N'端側は、真核生物での発現効率を高めるためのKozac配列（GCCATGG：ATGは開始コドンである）を導入し、C'端側のBamHIまたはSpeIサイトにインフレームで外来遺伝子を融合できるようにした。PCRは、以下の反応条件、テンプレート、およびプライマーを使用して行った。

【0053】テンプレート：プラスミドpM2、

N-terminal primer：

5'-GCGCCATGGTTAAATTAAAATT  
TGGTGT-3'（配列番号7）

C-terminal primer：

5'-CGCGAGCTCTTAAAGTTTCATCC  
TTTTCGGATCCTGGACTAGTAGGGG  
TACCGGGCCCGGGTCCATTTGCCAT  
ACTAATTGCGGCAATCGC-3'（配列番号8）

PCR条件：94℃において3分の後、94℃において45秒、55℃において1分、72℃において1分を30サイクル、次に72℃において10分。

【0054】CTBと融合遺伝子の分子間摩擦を最小限にとどめるため、CTBと融合遺伝子の間にヒンジ領域（GPGP）を挿入した。ヒンジ領域は、GPGPを1単位としてシングル、ダブル、トリプルとタンデムに3種構築した。その際、ヒンジ領域のコドンは植物種では比較的使用頻度の低いものを使用し、タンパク質翻訳の際リボソームが一時停止あるいは減速するようにした。また、植物細胞の小胞体内で組換えタンパク質が効率よく蓄積し、融合タンパク質が5量体を形成しやすくするために、小胞体残留シグナル（SEKDEL）を融合タンパク質のC'端側に挿入した。具体的には、SEKDELはコドン頻度の最も高いものを使用し、その後ろにストップコドンTAAを挿入した（TCC GAA AAG GAT GAA CTT TAA：それぞれS E K E D E L ストップコドン、に対応する）。

【0055】このように構築された融合遺伝子をCTBh<sub>1-3</sub>SEKDELとして、プラスミドベクターpIBT210.1内のカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流に挿入して、pIBT210.1-CTBh<sub>1-3</sub>SEKDELを作製した（図3）。

【0056】pIBT210.1への挿入は、SacIで消化した後（前記C末端プライマーには、SacI認識部位（GAGCTC）を組み込んである）、通常の方法でライゲーションを行った。

【0057】CTBh<sub>1-3</sub>SEKDELの全長は、自動塩基配列決定装置（ABI DNA sequencer 310）で確認した。次にこのプラスミドベクターからCTBh<sub>1-3</sub>SEKDEL発現カセットを持つT-DNA領域全体をHindIII-EcoRIで切



り出し、植物発現ベクターpBI121のHindIII-EcoRIフラグメントと入れ換えてpBI121-CTBh<sub>1</sub>-3SEKDELを作製した(図4)。この植物発現ベクターは、CTBの下流にBamHIおよびSpeIサイトを有し、これらの制限酵素サイトに外来遺伝子を挿入するとCTBとインフレームになり、CTB融合タンパク質を産生できる。

【0058】次に日本脳炎ウイルスE glycoprotein遺伝子の全長をウイルスのRNAゲノムからRT-PCR法によって増幅した。そのcDNAを基にして、遺伝子の3'側の約30%(E glycoproteinのアミノ酸残基300番から、アミノ酸残基377番まで(C1)、アミノ酸残基399番まで(C2)、アミノ酸残基426番まで(C3))をBamHI-SpeIサイトに挿入して、CTB-JEVE融合遺伝子を構築し(pBI121-CTB-JE)(図5)、上記のようにDNA sequencerを使用して、融合遺伝子の前塩基配列を確認し、CTBとJEVE遺伝子がインフレームであることを確認した。

【0059】ここで、図3~5を参照して、作製したpBI121-CTB-JEについて説明する。pBI121-CTB-JEのT-DNA領域は、RBとLBに挟まれた領域で以下の遺伝子を含む(RBとLBは、アグロバクテリウムによって認識され、植物核内にT-DNAのコピーを挿入する際に不可欠な塩基配列領域である)。

【0060】1. トランスジェニック植物に抗生物質カナマイシン耐性を賦与するフォスフォトランスフェラーゼ遺伝子(NPT-II)発現カセット(NOSプロモーター及びNOSターミネーター領域を含む)を含む。これは、組換え体選抜に必要な遺伝子である。

【0061】2. CTB-JE発現カセット(eCaMV35Sプロモーター\*、TEV5' 翻訳エンハンサー領域\*\*、及びVSP3' ターミネーター)を含む。ヒンジ領域の後方、SEKDEL小胞体残留シグナルの前方に日本脳炎ウイルスE-glycoproteinをCTB-ヒンジ領域とin frameになるように挿入したことにより、CTBタンパクとEタンパクはヒンジ部位によって隔たれている。また、植物の小胞体に組換えタンパクが蓄積されるように、E-glycoproteinの直ぐ後方にSEKDEL小胞体残留シグナルを結合した。CTBのN'末端にあるリーダーペプチドは、CTB遺伝子本来のものであり、グラム陰性菌のペリプラズム内へ移行する際に機能するが、植物発現用の構築物においては、植物細胞内の小胞体に移行する機能を果たす。

【0062】\*eCaMV35Sプロモーター：プロモーターの5'側が2重(タンデム)になっており、本来のCaMV35Sよりも数倍転写効率が高い。

【0063】\*\*TEV5' 翻訳エンハンサー：タバコ

に感染するウイルス由来の配列で、翻訳効率を向上させる塩基配列である。

【0064】アグロバクテリウムへのpBI121-CTB-JE遺伝子の導入

CTB-JEVE融合遺伝子を有するバイナリーベクター(pBI121-CTB-JE)をAgrobacterium tumefaciens LBA4404にエレクトロポレーション法で導入した。遺伝子導入の際、Bio Radのジーンパルサーを使用して、大腸菌への遺伝子導入と同一のプロトコルで行った。具体的には、2.5kV、25μF、200Ωにおいて、約30ng/μlのDNAを1μl(約30ngのDNA)を使用して行った。

【0065】遺伝子導入されたアグロバクテリウムをカナマイシン(50μg/ml)によって選択し、プラスミドミニプレップ法によって導入されたバイナリーベクターをアグロバクテリウムから取り出した。挿入前と比較してそのサイズに変化がないかどうかをいくつかの制限酵素で切断することによって確認した。

【0066】形質転換アグロバクテリウムに由来する融合タンパク質の検出

アグロバクテリウムをYEB溶液(リファンピシン50μg/ml)、ストレプトマイシン100μg/ml、カナマイシン50μg/ml)で培養し、バクテリアタンパク抽出液(50mM Tris-Cl、1mM EDTA、100mM NaCl)を使用して以下のように全水溶性タンパク質を抽出した。

【0067】1. 形質転換アグロバクテリウム1グラムにつき8μlのphenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF)および80μlのlysozyme(10mg/ml)を添加して、20分間室温でインキュベート。

【0068】2. アグロバクテリウム1グラムにつき4mgのdeoxychoic acidを添加して、37℃でインキュベート。

【0069】3. ライセートがどろどろになったところで、アグロバクテリウム1グラムにつきDNase I(1mg/ml)を添加して、約30分間室温でインキュベート。

【0070】4. 高速(40000g程度)の遠心(30分間遠心)でライセートを沈殿させ、上清を分離。

【0071】次に形質転換アグロバクテリウム由来のCTB-JE融合タンパク質がCTBの受容体であるGM1ガングリオシドに対する特異的親和性を保っていることを確認するために、GM1-ELISAを以下の要領で行った。

【0072】1. マイクロタイタープレートにmonosialoganglioside-GM1(Sigma G-7641)、100μl/ウェル(3.0μ

g/ml 重炭酸バッファー (15mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 35mM  $\text{NaHCO}_3$ )、PH9.6) により4℃において一晚コーティング。

【0073】2. プレートをPBST [phosphate buffered saline (PBS)、0.05% Tween-20] で洗浄し、1%ウシ血清アルブミン (BSA) で37℃において2時間ブロッキングして、再度洗浄。

【0074】3. 形質転換アグロバクテリウム抽出液を数段階にPBSで希釈し、100μl/ウェルで一晚4℃においてインキュベート。続いて洗浄。

【0075】4. CTBまたはJEVのEタンパク質を認識する一次抗体 (1000から5000倍希釈) を添加して37℃において2時間インキュベート。続いて洗浄。

【0076】5. アルカリホスファターゼ・コンジュゲートの二次抗体 (100μl/ウェル) を添加して、37℃において1時間インキュベート。続いて洗浄。

【0077】6. アルカリホスファターゼ基質 (100μl/ウェル) を添加して、室温において20分間発色させた後、O. D. 415nmで測定。

【0078】7. コントロールとしてCTBタンパク質 (Sigma) を使用して、植物由来のCTB融合タンパク質を測定。

#### 【0079】結果

形質転換アグロバクテリウムは、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターにより、その下流に存在す

るCTB-JEV融合タンパク質を産生していることが確認された。

【0080】2. アグロバクテリウム由来の融合タンパク質を使用したマウス粘膜免疫実験。

#### 【0081】方法

菌体の粗抽出液を用いてマウスの免疫実験を行った。免疫ルートとして、経口、経鼻、腹腔の3ルートから行い、週1回の計4回免疫した。最終免疫から1週間後に尻尾から採決した血清を用いて抗体価の測定を行った。中和試験では、日本脳炎ウイルスの北京株を用いて、日本脳炎ワクチン試験で行われているように、血清希釈度10倍以上でブラック数が半減する場合を中和抗体陽性とした。

#### 【0082】結果

経口および経鼻によるルートのみ菌体成分に対する抗体が上昇せず、発現タンパク質のみを特異的に認識する抗体の誘導が確認された。また、経口投与群では5匹中4匹がウイルス中和抗体を産生していることがわかった。

【0083】融合タンパク質は粘膜投与によって、従来の日本脳炎ワクチン投与法は、注射接種により抗体誘導を行うが、同等な効果を得ることができる。すなわち、コレラトキシンB鎖タンパク質との融合タンパク質を作製することによって、ウイルス外殻タンパク質を効率よく腸管粘膜組織に運搬し、全身性の免疫応答を誘導することが可能である (表1)。

#### 【0084】

【表1】

接種ルート	ELISA No. positive/mice (OD)		中和抗体
	CTB-JE	菌体成分	
経口	5/5 (0.465)	0/5 (0.024)	4/5
経鼻	5/5 (0.486)	0/5 (0.069)	1/5
腹腔	5/5 (2.430)	5/5 (0.576)	1/5

3. 日本脳炎ワクチンの経鼻接種によるウイルス中和抗体の誘導実験。

#### 【0085】方法

現行の日本脳炎ウイルスワクチンの粘膜免疫による抗体誘導能を調べるため、マウスを使用して経鼻免疫実験を行った。週一回、計4回接種し、最終免疫から1週間後に抗体価の測定を行った。中和試験に関しては、上記のCTB-JE融合タンパク質摂取の場合と同様に行った。

【0086】粘膜免疫ルート効率を調べるために、現

行日本脳炎ワクチンを希釈し、経鼻免疫した後、ELISAによって抗体価と中和抗体価を調べた。

#### 【0087】結果

結果は表2の通りである。免疫開始3週間後から抗体価の上昇が認められた。ワクチン単独でも、アジュバントとの混合でも、抗体価の上昇が認められたが、アジュバントの混合によりELISA抗体価と中和抗体価に著しい上昇が確認された (表2)。

#### 【0088】

【表2】

接種ルート	抗原 (ng)	ELISA No. positive/mice (OD)	中和抗体価
経鼻	日本脳炎ワクチン (384ng)	3/5 (0.198)	5/5 (624)
経鼻	日本脳炎・CT 混合 ワクチン (384ng)	5/5 (1.123)	5/5 (2,154)

【0089】粘膜免疫ルートの効率は、腹腔投与に使われるワクチン量(134ng)と比較すると、混合ワクチンの場合でも約3倍量のワクチンが必要であることが明らかとなった。アジュバントを使用しない場合は、そ

の10倍量を投与しても抗体価の上昇が確認されなかった(表3)。

【0090】

【表3】

日本脳炎ワクチン					
ワクチン量 (ng)	1,200	400	134*	45	15
ELISA	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
中和試験	0/4	0/4	0/4	0/4	0/4
日本脳炎ワクチン+CT					
	1,200	400	134*	45	15
	4/4	3/4	0/4	0/4	0/4
	4/4	4/4	1/4	1/4	0/4

\*134 ng は通常のマウス実験でワクチンに使用される量

4. トランスジェニックタバコによる融合タンパク質の発現。

【0091】方法

アグロバクテリウム感染によるタバコの形質転換

構築したバイナリーベクター pBI121-CTB-JE を植物核染色体内に導入する能力を持つ土壌細菌の一種であるアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) へ挿入する。pBI121-CTBh<sub>1</sub>-3SEKDEL を菌体内に持つアグロバクテリウムをリファンピシン (50 ng/ml)、ストレプトマイシン (100 μg/ml)、カナマイシン (50 μg/ml) を含む YEB 培地 (1 l あたり: Beef Extract 5g, Bacto yeast extract 1g, Sucrose 5g, Bacto Ager 9g, pH 7.3) で3日間培養し、アセトシリゴン (370 μM) を含む滅菌した MSO 培養液 (1 pack/l MS salts, 3.0% sucrose, 1×B5 vitamins, pH 5.8) に 10<sup>9</sup>–10<sup>10</sup> bacteria/ml 程度になるように懸濁した。滅菌したタバコの趣旨を MS 培地で発芽させ、葉が 7–8 枚出るくらいまで培養した後、葉を取り、メスで格子状 (2 cm 四方くらい) に切り出した。これら切り取ったリーフディスクは感染が起こりやすいように、ナイフで所々に傷を付け、形質転換アグロバクテリウムの懸濁液に 1–2 分間浸し、取り出した後に余分な液体を取り除いて、MS 寒天

培地の上に、必ず裏側が上になるように (気孔側を上にして) 隙間なく敷き詰めた。シャーレをパラフィルムで閉じて、2カ所ほど空気孔をあけ、暗室で3日間室温においてインキュベートして感染を促した。3日後に、リーフディスクを取りだし、カナマイシン (50 μg/ml)、NAA (100 μg/ml)、クラフオラン (300 μg/ml) を含む MS 選択培地に移し替えた。から2週間程度でカルス化が進行した後、シュートが形成され、葉が 2–3 枚程度になった時点でカルスから切り出し、MS 選択培地で個別に培養を続けた。シュートから根が形成されて、植物体が成長し始めた後、土に移植し、さらに成長させた。

【0092】形質転換タバコの解析

カナマイシン耐性を示すタバコからゲノム DNA を抽出し、CTB 領域を特異的に増幅するプライマーセット、配列を使用して PCR 増幅 (最初に 94℃ で 3 分、次に 94℃ で 45 秒、55℃ で 1 分、72℃ で 1 分を 30 サイクル、最後に 72℃ で 10 分) を行い、タバコが形質転換されていることを確認した。形質転換されているタバコは、以下の要領で植物タンパク抽出バッファー (200 mM Tris-Cl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 400 mM Sucrose, 10 mM EDTA, 14 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.05% Tween-20) を用いて、水溶性の全タンパク質を抽出した。

【0093】1. 1gの植物組織(タバコのは、ジャガイモの根茎等)につき1mlの抽出バッファーを使用して氷上のすり鉢でする。

【0094】2. ホモジネートを17000×g、4℃で15分間遠心。

【0095】3. 上清を回収して、もう一度遠心。

【0096】4. 上清をタンパク質アッセイに使用する。この時タンパク質は10~20μlにつき約50~100μgになる。

【0097】タンパク抽出液を使用して、CTB-JE融合タンパク質がCTBの受容体であるGM1ガングリオシドに対する特異的親和性を保っていることを確認するために、GM1-ELISAを以下の要領で行った。

【0098】1. マイクロタイタープレートにmonosialoganglioside-GM1 (Sigma G-7641)、100μl/ウェル(3.0μg/ml 重炭酸バッファー(15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、35mM NaHCO<sub>3</sub>)、PH9.6)により、4℃において一晚コーティング。

【0099】2. プレートをPBST [phosphate buffered saline (PBS)、0.05% Tween-20] で洗浄し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)で37℃において2時間ブロッキングして、再度洗浄。

【0100】3. 形質転換アグロバクテリウム抽出液を数段階にPBSで希釈し、100μl/ウェルで一晚4℃においてインキュベート。続いて洗浄。

【0101】4. CTBまたはJEVのEタンパク質を認識する一次抗体(1000から5000倍希釈)を添加して37℃において2時間インキュベート。続いて洗浄。

【0102】5. アルカリホスファターゼ・コンジュゲートの二次抗体(100μl/ウェル)を添加して、37℃において1時間インキュベート。続いて洗浄。

【0103】6. アルカリホスファターゼ基質(100μl/ウェル)を添加して、室温において20分間発色させた後、O. D. 415nmで測定。

【0104】7. コントロールとしてCTBタンパク質(Sigma)を使用して、植物由来のCTB融合タンパク質を測定。

#### 【0105】結果

トランスジェニックタバコを数固体解析した結果、タバコの葉に由来する全水溶性タンパク質1gにつき、2~12μgの組換えCTB-JE融合タンパク質が産生されていることが確認された(図6)。

#### 【0106】

【発明の効果】従来の日本脳炎ワクチン投与法は、注射接種により抗体誘導を行うが、本発明では、融合タンパク質の粘膜投与により、それと同等な効果を得ることができる。すなわち、コレラトキシンB鎖タンパク質との融合タンパク質を作製することにより、ウイルス外殻タンパク質を効率よく腸管粘膜組織に運搬し、全身系の免疫応答を誘導することが可能である。この融合タンパク質が導入されたトランスジェニック植物の作成が可能であるため、食用の植物に遺伝子発現させることにより、直接腸管粘膜を介して免疫することが可能である。上記の構成およびその粘膜免疫投与法は、ヒト、家畜動物を含む脊椎動物全般に応用できるものであり、「食べるワクチン」としての利用が期待されている

#### 【0107】

#### 【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> The transgenic plant that contain the gene coding a japanese encephalitis virus vaccines.

<120> The president of University of Ryukyu

<130> A0001001463

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Primer

<400> 1

gcgccatggt taaattaaaa ttigtgtgtt

<210> 2

<211> 90

<212> DNA

<213> Primer

<400> 2

cgcgagctct taaagttcat ccttttcgga tcctggacta gtaggggtac cgggcccggg

29

60

```

tccatttgcc atactaattg cggcaatcgc          90
<210> 3
<211> 27
<212> DNA
<213> Primer
<400> 3
gcgggatcca cctatggcat gtgcaca          27
<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Primer
<400> 4
gcgactagtt ccgaaggggg gttccat          27
<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Primer
<400> 5
gcgactagta gctttatgcc aatgggt          27
<210> 6
<211> 27
<212> DNA
<213> Primer
<400> 6
gcgactagtc ccttgtgtga tccaaga          27
<210> 7
<211> 29
<212> DNA
<213> Primer
<400> 7
gcgccatggt taaattaataa ttggtgtt          29
<210> 8
<211> 90
<212> DNA
<213> Primer
<400> 8
cgcgagctct taaagttcat ccttttcgga tcctggacta gtaggggtac cgggcccggg          60
tccatttgcc atactaattg cggcaatcgc          90

```

【図面の簡単な説明】

【図1】CTB-JE融合タンパク質の応用例を示す図。

【図2】日本脳炎ウイルスE glycoproteinの増幅部位を示す模式図。

【図3】コレラトキシンB鎖タンパク質(CTB)との融合タンパク質を含む発現ベクター、pIBT210、1-CTBh<sub>1</sub>-3SEKDELを示す模式図。

【図4】コレラトキシンB鎖タンパク質(CTB)日本脳炎ウイルス外郭タンパク質(E glycoprot

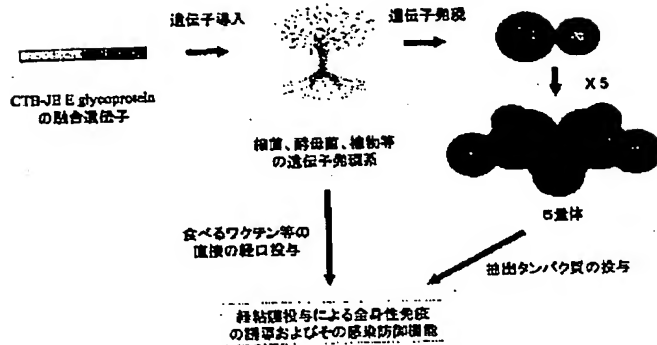
ein)(JEV)との融合タンパク質を含む植物発現ベクター、pBI121-CTBh<sub>1</sub>-3SEKDELを示す模式図。

【図5】コレラトキシンB鎖タンパク質(CTB)日本脳炎ウイルス外郭タンパク質(E glycoprotein)(JEV)との融合タンパク質を含むバイナリーベクター、pBI121-CTB-JEを示す模式図。

【図6】タバコにおけるCTB-JE融合タンパク質の発現量を示す図。

【図1】

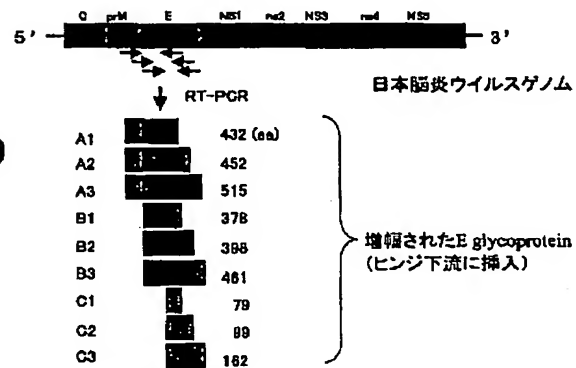
## CTB-JE 融合ワクチンの産生とその応用



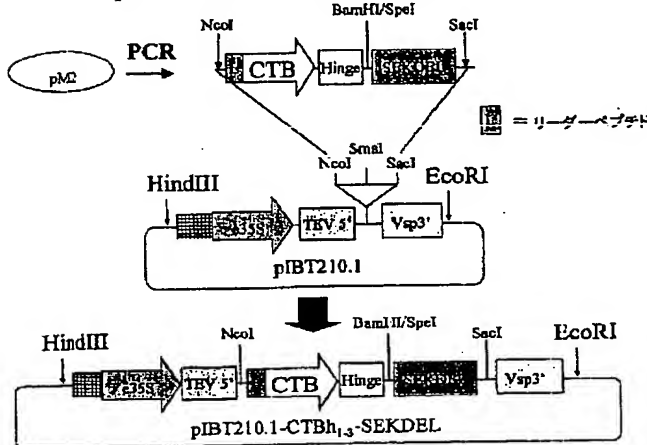
【図3】

【図2】

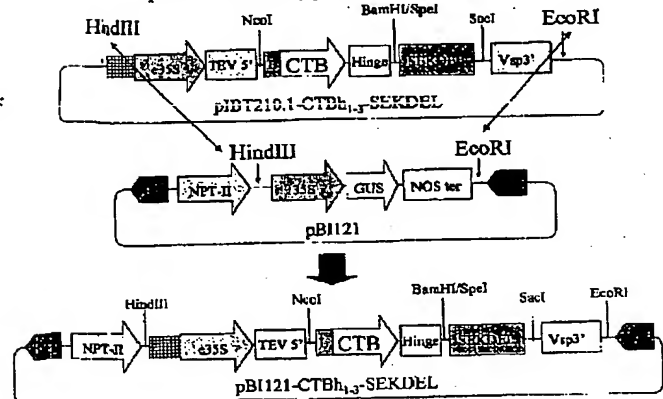
## 日本脳炎ウイルスE glycoproteinの増幅



【図4】

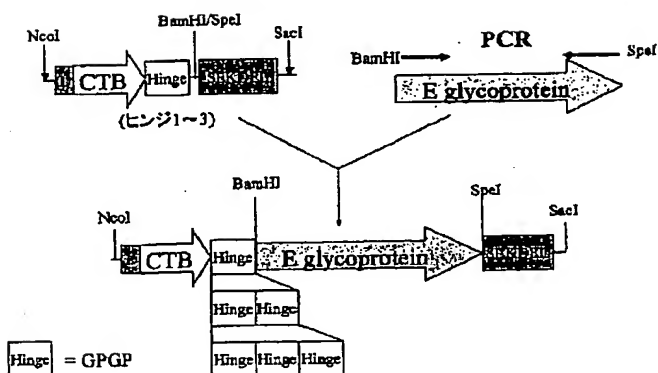
pIBT210.1-CTB<sub>h1-3</sub>-SEKDELの構築

【図5】

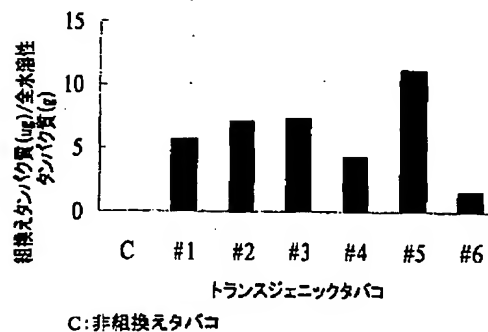
pBI121-CTB<sub>h1-3</sub>-SEKDELの構築

【図6】

## pBI121-CTB-JEの構築



## 植物におけるCTB-JE融合ワクチンの発現



## フロントページの続き

(72)発明者 辻 尚利  
茨城県つくば市松代4-415-1  
(72)発明者 佐藤 良也  
沖縄県北中城村安谷屋693-1  
(72)発明者 福永 利彦  
沖縄県那覇市首里石嶺町4-58

(72)発明者 佐藤 茂俊  
沖縄県中頭郡西原町字千原1番地 琉球大  
学農学部内  
(72)発明者 長嶺 勝  
沖縄県那覇市首里末吉町1-180-9  
(72)発明者 倉根 一郎  
東京都千代田区一番町17-7-601  
Fターム(参考) 2B030 CA15 CA17 CA19  
4B024 AA01 AA07 BA32 BA38 CA04  
CA07 DA01 EA02 EA04 GA11

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**